



УДК: 616.22-006.6

ЭКСПРЕССИЯ P53 КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР В ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОРТАНИ?

Р. Н. Кулагин

IS P53 A PROGNOSTIC FACTOR IN PATIENTS WITH LARYNGEAL CARCINOMA?

R. N. Kulagin

ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России»

(Ректор – проф. А. С. Созинов)

Материалом для иммуногистохимического исследования служили парафиновые срезы 173 случаев плоскоклеточного рака гортани. Для исследования использовалось антитело p53 (клон DO7). Экспрессия p53 обнаружена в 109 случаях, что составляет 63%. Экспрессия мутантного белка p53 связана с лучшей выживаемостью ($p < 0,05$). Не обнаружена связь между сверхэкспрессией мутантного белка p53 с клинической стадией, рецидивами, наличием регионарных метастазов в лимфатические узлы, степенью гистологической дифференцировки G и возрастом больных плоскоклеточным раком гортани. Сверхэкспрессия мутантного белка p53 не является важным прогностическим фактором, ухудшающим течение плоскоклеточного рака гортани.

Ключевые слова: рак гортани, иммуногистохимия, p53, прогноз.

Библиография: 24 источника.

173 cases (biopsy and operation material) of squamous laryngeal cancer were analyzed using of monoclonal antibody p53 (clone DO7). P53 expression was found in 109 (63%) of the patients. There was a significant correlation between p53 expression and with better survival rates ($p < 0,05$). No relationship was observed with histologic differentiation, clinical and tumor (T) stages, recurrence and nodal metastasis. Our results suggest that p53 expression is not a prognostic factor in laryngeal cancer.

Key words: laryngeal cancer, immunohistochemistry, p53, prognosis.

Bibliography: 24 sources.

Вот уже более 20 лет p53 притягивает к себе внимание в качестве прогностического маркера для многих опухолей человека. Это касается и опухолей головы и шеи, включая плоскоклеточный рак гортани, заболеваемость которым в последние десятилетия остается стабильно высокой.

Рак – это многостадийный и очень сложный процесс, в котором одну из главных ролей играют мутации в генах-супрессорах, одним из которых является ген p53. Гены-супрессоры отвечают за кодировку белков, верифицирующих повреждения или дефекты последовательности ДНК клетки, блокирующих клеточный цикл в G1-фазе, и, если это возможно, восстанавливают последовательность ДНК, а в случае, если дефекты не подлежат восстановлению, то способны активировать механизмы клеточной смерти или апоптоз. Ген p53 локализуется в 17-й хромосоме и кодирует ядерный фосфопротеин с молекулярной массой 53 кДа (кратко p53, «природный», или «дикий», тип). Этот белок синтезируется в малых количествах и очень быстро распадается. Мутантные формы p53, напротив, синтезируются в больших количествах, а период полураспада достигает суток, что позволяет их легко выявлять иммуногистохимически и использовать в диагностике злокачественных опухолей. В большом количестве работ исследована экспрессия p53 в плоскоклеточном раке головы и шеи и, в частности, в раке гортани. Данные авторов противоречивые, неполные и выполнены на небольшом количестве материала [2, 7, 9, 13, 15, 16, 18].

Цель работы. Изучение экспрессии мутантного белка p53 в плоскоклеточном раке гортани, а также выявление его взаимосвязи с известными прогностическими факторами: клинической стадией, выживаемостью, наличием рецидивов и метастазов в регионарные лимфатические узлы, а также степенью гистологической дифференцировки.

Материалы и методы. Материалом для иммуногистохимического исследования служили парафиновые срезы 173 случаев плоскоклеточного рака биопсийного и операционного мате-



Таблица

Распределение больных раком гортани по основным клинико-морфологическим показателям и результаты экспрессии p53

	Число пациентов	p53 ⁺	p53 ⁻
<i>Всего</i>	173	109	64
Возраст:			
≤	5	5	0
≤	88	53	35
>	80	52	28
Клиническая стадия:			
I	18	13	5
II	35	21	14
III	66	47	19
IV	51	29	22
Стадия распространения опухоли (T-стадия):			
I	18	13	5
II	49	29	20
III	68	48	20
IV	35	20	15
Степень дифференцировки опухоли:			
G1	51	31	20
G2	41	26	15
G3	79	53	26
Локализация в полости гортани:			
над связками	57	35	22
голосовые связки	49	33	16
подсвязочное пространство	6	2	4
трансларингиально*	59	40	19
Рецидивы:			
есть	22	10	12
нет	151	99	52
Регионарные метастазы:			
есть	45	27	18
нет	128	82	46

* Экспрессия p53 статистически выше у больных, проживших 5 и более лет.

риала, полученного от больных, которые прошли лечение в Республиканском клиническом онкологическом диспансере с 1994 по 2006 г. При оценке каждого случая учитывались возраст больных, локализация и распространение опухоли (T-стадия), наличие или отсутствие метастазов и рецидивов, гистологическая структура (G) и клиническая стадия опухоли в соответствии с системой TNM (табл.). Степень последней оценивали по стандартным критериям [4]. Средний возраст – 59,3 года. Пятилетняя выживаемость больных составила 50,3% (87 больных).

Для исследования использовалось моноклональное антитело против p53 (клон DO7). Обработка и окрашивание материала проводились по схеме профессора С. В. Петрова [3]. В качестве системы визуализации применяли стрептавидин-биотиновый метод в наборе LSAB + (DAKO), пероксидазу проявляли раствором диаминобензида или аминоэтилкарбазола.

Подсчет индекса p53 проводился с использованием морфометрической окулярной сетки Г. Г. Автандилова [1]. В каждом случае вычислялся процент окрашенных клеток. Для этого были подсчитаны 100 клеток в 10 полях зрения с увеличением $\times 400$. Учитывались только интенсивно окрашенные в черно-коричневый цвет ядра, а зернистое и светло-коричневое окрашивание ядер считалось отрицательной реакцией. Статистическую обработку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Экспрессия p53 обнаружена в 109 случаях, что составляет 63%. Результат представлен в таблице. Процент интенсивно окрашенных клеток колебался от 1 до



95 (рис.). У выживших больных экспрессия p53 наблюдалась в 62 случаях (71,3%), а у умерших – в 47 (54,7%) ($p < 0,05$). Обнаружены статистические различия при исследовании локализации плоскоклеточного рака в полости гортани. Так, в надсвязочных опухолях и в опухолях голосовых складок экспрессия p53 статистически выше, чем в подсвязочных опухолях ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Не обнаружена связь сверхэкспрессии мутантного белка p53 с клинической стадией, рецидивами, наличием регионарных метастазов в лимфатические узлы, степенью гистологической дифференцировки G и возрастом больных плоскоклеточным раком гортани.

Обсуждение. По литературным данным экспрессия p53 обнаружена в 40–90% опухолей головы и шеи, включая рак гортани. Такой разброс результатов объясняется множеством обстоятельств. Авторы использовали различные моноклональные и поликлональные антитела против p53, различные критерии оценки и шкалы реакции. Положительной реакцией считалось любое, даже светло-коричневое окрашивание ядер, а в качестве отрицательных значений использовался минимальный процент окрашенных ядер от 5 до 25% [2, 13, 19, 21, 23]. Необходимо помнить тот факт, что сверхэкспрессия p53 не всегда указывает на мутацию онкогена. У некоторых больных «природный» p53 может стабилизироваться mdm2-белком или некоторыми вирусами, что приводит к ложнопозитивной иммуногистохимической реакции [10]. Возможна и ложноотрицательная реакция вследствие мутации, которая приводит к уменьшению или полному отсутствию p53 [20]. В нашей работе обнаружена экспрессия мутантного белка p53 в 109 случаях (63%) при отсутствии нижней границы. Необходимо помнить тот факт, что в рутинной иммуногистохимической диагностике используется 10%-ная граница, ниже которой экспрессия p53 является отрицательной.

Связь между повреждением p53 и прогнозом у больных раком головы и шеи, включая плоскоклеточный рак гортани, остается предметом обсуждения в многочисленных работах. Однако эти исследования имели ряд недостатков: малое число больных, разнородные группы, разнообразные морфологические варианты опухолей [2, 5, 14, 21, 24]. Тем не менее иммуногистохимическое выявление p53 в первичной опухоли остается привлекательным инструментом в клинической практике. Это очень быстро, дешево и может быть легко выполнено на очень незначительном биопсийном материале.

Многие исследователи не сообщают о значимой связи между экспрессией p53 и прогнозом или клинико-патологическими параметрами рака гортани, такими как стадия, дифференцировка, инвазивность, наличием метастазов в лимфатические узлы или другие органы и выживаемостью [11, 13, 15, 19, 21, 22]. Некоторые авторы [6, 12] уверены, что сверхэкспрессия p53 ухудшает прогноз для больных раком головы и шеи и гортани, а также статистически связана с некоторыми клинико-морфологическими факторами. Так, M. J. Ashraf et al. [9], исследовав 54 больных, обнаружили корреляцию между сверхэкспрессией мутантного белка с

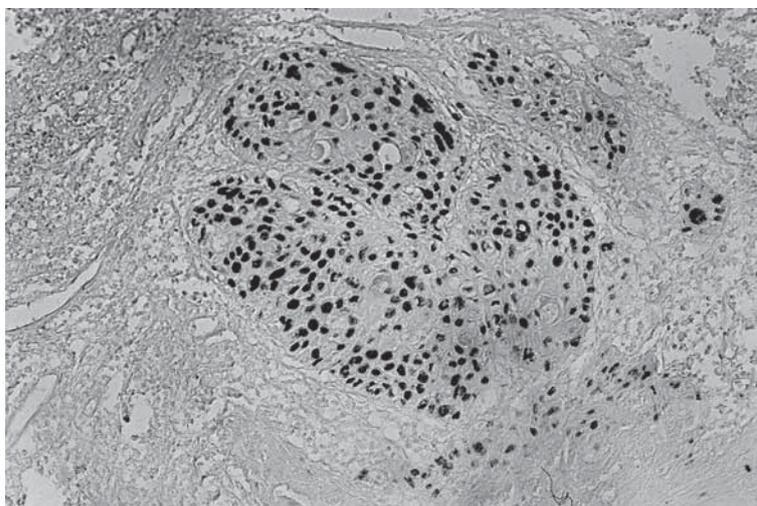


Рис. Экспрессия p53 в плоскоклеточном раке гортани. LSAB+-метод, хромоген – диаминобензидин $\times 200$.



локализацией, клинической стадией и наличием метастазов в лимфатические узлы. В других работах наличие p53 увеличивает агрессивность опухоли, и это возможная причина снижения радио-и химиочувствительности [17, 23]. Н. А. Горбань с коллегами [2] в своем исследовании обнаружили связь с более частым развитием рецидивов и худшей выживаемостью, что также увеличивает агрессивность опухоли. В нашей работе не была обнаружена связь с известными клиничко-анатомическими параметрами.

В литературе также описаны противоречивые результаты корреляции между накоплением p53 в ядре и выживаемостью. Так, М. F. Spafford et al., S. C. Girod et al. нашли корреляцию с худшей выживаемостью [7, 8]. В нашем исследовании обнаружено, что экспрессия мутантного белка p53 связана с лучшей выживаемостью больных раком гортани ($p < 0,05$), что подтверждается работой Р. Hirvikoski et al. [18]. Большинство исследователей не обнаружили какой-либо связи с экспрессией исследуемого маркера [6, 7, 12, 16, 19].

Выводы

1. Экспрессия p53 статистически выше у больных, проживших 5 лет и более.
2. Сверхэкспрессия мутантного белка p53 не является важным прогностическим фактором, ухудшающим течение инвазивного плоскоклеточного рака гортани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Горбань Н. А., Тен В. П., Панкратов В. А. Экспрессия антигена Ki-67 и белка p53 как показателей агрессивности течения плоскоклеточного рака гортани // Вопросы онкологии. – 2007. – № 6. – С. 668–673.
3. Петров С. В., Райхлин Н. Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – К., 2012. – 624 с.
4. Справочник по классификации злокачественных опухолей / Пер. с англ. – СПб.: Медакадемия, 2007. – 432 с.
5. Blons H., Laurent-Puig P. TP53 and head and neck neoplasms // Hum. Mutat. – 2003. – Vol. 21. – P. 252–257.
6. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer / K. Vlachtsis [et al.] // Eur Arch Otorhinolaryngol. – 2005. – Vol. 262. – P. 890–898.
7. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma / M. F. Spafford [et al.] // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 1996. Vol. 122. – P. 627–632.
8. Detection of p53 and MDM2 protein expression in head and neck carcinogenesis / S. C. Girod [et al.] // Anticancer Res. – 1995. – Vol. 15. – P. 1453–1457.
9. Expression of Ki-67 and P53 in primary squamous cell carcinoma of the larynx / M. J. Ashraf [et al.] // Indian J. of Pathology and Microbiology. – 2010. – Vol. 53 (4). – P. 661–665.
10. Hall P. A., Lane D. P. P53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited! // J. Pathol – 1994. – Vol. 172. – P. 1–4.
11. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value / F. X. Bosch [et al.] // Int. J. Cancer. – 2004. – Vol. 111. – P. 530–538.
12. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? / A. Narayana [et al.] // Cancer. – 1998. – Vol. 82. – P. 286–291.
13. Mielcarek-Kuchta D., Olofsson J., Golusinski W. P53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma // Eur Arch Otorhinolaryngol. – 2003. – Vol. 260. – P. 549–554.
14. Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma / B. D. Smith [et al.] // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2001. – Vol. 127. – P. 780–785.
15. Prognostic value of cell proliferation markers, tumor suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx / M. Liu [et al.] // Eur Arch Otorhinolaryngol. – 2003. – Vol. 260. – P. 28–34.
16. Prognostic value of expression of p53, proliferating cell nuclear antigen, and c-erbB-2 in laryngeal carcinoma / D. Micozkadioğlu [et al.] // Med Sci Monit. – 2008. – Vol. 14, N 6. – P. 299–304.
17. P53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma / C. Couture [et al.] // Cancer. – 2002. – Vol. 94, N 3. – P. 713–722.
18. P53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma / P. Hirvikoski [et al.] // J Clin Oncol. – 1997. – Vol. 15. – P. 3111–3120.
19. P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases. New results for an old question / R. Cabanillas [et al.] // Cancer. – 2007. – Vol. 109, N 9. – P. 1791–1798.
20. P53 mutations in human cancers / M. Hollstein [et al.] // Science. – 1991. – Vol. 253. – P. 49–53.
21. P53 over-expression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications / R. Dolcetti [et al.] // Int J Cancer. – 1992. – Vol. 52. – P. 178–182.
22. P53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis / D. M. Shin [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2001. – Vol. 10. – P. 603–609.